

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

20. 5. 2004

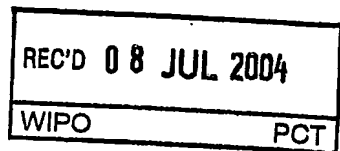
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 5月22日

出願番号
Application Number: 特願2003-145466
[ST. 10/C]: [JP 2003-145466]

出願人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構



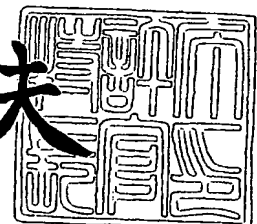
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3054477

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03072-SH

【提出日】 平成15年 5月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 21/76
G01N 33/53
G01N 33/535
G01N 33/68

【発明の名称】 蛋白質相互作用解析用プローブ及びそれを用いた
蛋白質相互作用の解析方法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区市ヶ谷薬王寺町 4 5 - 1 - 2 0 3

【氏名】 梅澤 喜夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区西葛西 3 - 8 - 7 - 1 0 0 5

【氏名】 貝原 麻美

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県松戸市稔台 6 1 7 - 1 8

【氏名】 小澤 岳昌

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区白山 1 - 3 3 - 1 9 - 6 0 7

【氏名】 佐藤 守俊

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質相互作用解析用プローブ及びそれを用いた蛋白質相互作用の解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなることを特徴とする蛋白質相互作用解析用プローブ。

【請求項 2】 プローブAは、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドとともにinteinのN-末端側のポリペプチドを含み、プローブBは、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドとともにinteinのC-末端側のポリペプチドを含む請求項 1 の蛋白質相互作用解析用プローブ。

【請求項 3】 レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドと、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドに、各々リンカー配列が結合している請求項 1 または 2 のいずれかの蛋白質相互作用解析用プローブ。

【請求項 4】 リンカー配列は、3～20アミノ酸残基からなるものである請求項 3 の蛋白質相互作用解析用プローブ。

【請求項 5】 レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドは、レニラルシフェラーゼをSer91とTyr92の間で分割して得られるものである請求項 1 ないし 4 の蛋白質相互作用解析用プローブ。

【請求項 6】 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブAを連結した蛋白質aと請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブBを連結した蛋白質bを、セレンテラジンと酸素の存在下で共存させ、発光を測定することを特徴とする蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法。

【請求項 7】 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブAを連結した蛋白質aと請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブBを連結した蛋白質bを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することによりプローブAを連結した蛋

白質 a とプローブ B を連結した蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる請求項 6 の蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法。

【請求項 8】 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブ A を連結した蛋白質 a とプローブ B を連結した蛋白質 b をセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる請求項 6 の蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法。

【請求項 9】 請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ A を連結した蛋白質 a と請求項 1 ないし 5 記載のいずれかのプローブ B を連結した蛋白質 b を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物。

【請求項 10】 請求項 9 の非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における蛋白質相互作用を解析する物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、生細胞内の、どこで、いつ蛋白質-蛋白質相互作用が生じたかを検出・定量するための蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、生細胞内や個体内における種々の蛋白質-蛋白質相互作用に関わる細胞内シグナル増強/抑制物質を、精度高く、高速にスクリーニングすることを可能とする蛋白質相互作用解析用プローブと、それを用いた蛋白質-蛋白質相互作用解析方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】

生細胞の構築や機能においては、蛋白質-蛋白質相互作用が重要な役割を果たしていることが知られている。また、遺伝子の転写機構や細胞内シグナル伝達な

どにおいても、蛋白質相互作用が関連することが知られている。

【0003】

従来、蛋白質-蛋白質相互作用を解析するための方法としては、スプリット酵素法が報告されている（非特許文献1～4）。この方法では、開裂した酵素が蛋白質-蛋白質相互作用により再構築され、それにより復旧された酵素活性を菌や細胞の表現型、あるいは蛍光性酵素基質によって測定して蛋白質-蛋白質相互作用を検出する。

【0004】

しかし、このようなスプリット酵素法では、酵素反応に時間を要する上、酵素反応により産生された蛍光性酵素基質が安定な物質であり、細胞内において拡散するため、蛋白質相互作用が起きた場所や時を細胞内で特定できないという問題があった。

【0005】

そこで、この出願の発明者らは、あらゆる蛋白質について高い精度で簡便に蛋白質-蛋白質相互作用を解析できるプローブとして、蛋白質相互作用により生起するプロテインスプライシングにより発光酵素やGFPが生成され、発光酵素などの酵素活性やGFPのフルオロフォアが再生される蛋白質相互作用解析用プローブを作成し、報告している（特許文献1、2）。

【0006】

しかし、酵素の蛍光性生成物やGFPなどのフルオロフォアは拡散性であるため、このような蛋白質相互作用解析用プローブでも、蛋白質-蛋白質相互作用がいつ、どの部位で生じたのかを特定することは困難であったのが実情である。

【0007】

【特許文献1】

特願 2000-224939

【特許文献2】

PCT/JP00/09348

【非特許文献1】

Rossi, F., Charlton, C.A. and Blau, H. M., Proc. Natl. Acad. Sci. US

A, 94, 8405-8410, 1997

【非特許文献 2】

Remy, I., and Michnick, S. W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 5394-5399, 1999

【非特許文献 3】

Pelletier, J. N., Arndt, K. M., Pluckthun, A., and Michnick, S. W., Nature Biotech. 17, 683-690, 1999

【非特許文献 4】

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 5752-5756

【非特許文献 5】

Lorenz, W. W. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4438-4442 (1991).

【非特許文献 6】

Paulmurugan, R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 15608-13 (2002).

【非特許文献 7】

Liu, J. et al. Gene 203, 141-148 (1997).

【非特許文献 8】

Liu, J. & Escher, A. Gene 237, 153-159 (1999).

【非特許文献 9】

Contag, C. H. & Bachmann, M. H. Annu. Rev. Biomed. Eng. 4, 235-260 (2002).

【非特許文献 10】

Greer, L. F. & Szalay, A. A. Luminescence 17, 43-74 (2002).

【非特許文献 11】

Duan, X., Gimble, F. S. and Quijcho, F. A., Cell 89, 555-564, 1997

【非特許文献 12】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77; 7380-7384, 1980

【非特許文献 1 3】

Ozawa, T. et al. Anal. Chem. 73, 2516-2521 (2001).

【非特許文献 1 4】

Sato, M. et al. Nat. Biotechnol. 20, 287-294 (2002).

【非特許文献 1 5】

Sato, M. et al. Anal Chem. 71, 3948-3954 (1999).

【非特許文献 1 6】

Pratipanawat, W. et al. Diabetes 50, 2572-2578 (2001).

【非特許文献 1 7】

Yoshimura, R. et al. Diabetes 46, 929-936 (1997).

【非特許文献 1 8】

Golstein, B. J. et al. J. Biol. Chem. 275, 4283-4289 (2000).

【非特許文献 1 9】

Blakely, B. T. et al. Nat. Biotechnol. 18, 218-222 (2000).

【非特許文献 2 0】

Rossi, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 8405-8410 (1997).

【非特許文献 2 1】

Remy, I. & Michnick, S. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5394-5399 (1999).

【非特許文献 2 2】

Galarneau, A. et al. Nat. Biotechnol. 20, 619-622 (2002).

【非特許文献 2 3】

Wehrman, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 3469-3474 (2002).

【0 0 0 8】

そこで、この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、生細胞内の、どこで、いつ蛋白質-蛋白質相互作用が生じたかを検出・定量するためのプローブと、それを用いた蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法を提供することを課題としている。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなることを特徴とする蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

【0010】

この出願の発明は、第2には、前記の蛋白質相互作用解析用プローブに関連して、inteinのN-末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、inteinのC-末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなる蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

【0011】

この出願の発明は、また、第3には、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドと、レニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドに、各々リンカー配列が結合している前記いずれかの蛋白質相互作用解析用プローブを、第4には、リンカー配列が3～20アミノ酸残基からなるものである前記の蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

【0012】

さらに、この出願の発明は、第5には、レニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドとレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドは、レニラルシフェラーゼをSer91とTyr92の間で分割して得られるものである前記いずれかの蛋白質相互作用解析用プローブを提供する。

【0013】

この出願の発明は、さらに、第6には、前記いずれかのプローブAを連結した蛋白質aと前記いずれかのプローブBを連結した蛋白質bを、セレンテラジンと酸素の存在下で共存させ、発光を測定することを特徴とする蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

【0014】

また、この出願の発明は、第7には、前記いずれかのプローブAを連結した蛋白質aと前記いずれかのプローブBを連結した蛋白質bを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入することによりプローブAを連結した蛋白質aとプローブBを連結した蛋白質bをセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

【0015】

この出願の発明は、第8には、前記いずれかのプローブAを連結した蛋白質aと前記いずれかのプローブBを連結した蛋白質bを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞においてプローブAを連結した蛋白質aとプローブBを連結した蛋白質bをセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる蛋白質相互作用の解析方法を提供する。

【0016】

さらに、この出願の発明は、第9には、前記いずれかのプローブAを連結した蛋白質aと前記いずれかのプローブBを連結した蛋白質bを発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって得られる非ヒト動物またはその子孫動物を提供する。

【0017】

そして、第10には、前記非ヒト動物またはその子孫動物に検査試料を導入し、該非ヒト動物またはその子孫動物の細胞における蛋白質相互作用を解析する物質のスクリーニング方法をも提供する。

【0018】

【発明の実施の形態】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブは、標識物質としてレニラルシフェラーゼを用いることを特徴とするものである。

【0019】

レニラルシフェラーゼ（非特許文献5）（配列番号1）は、ホタルルシフェラーゼの約半分の分子量（36 kDa）を有するモノマー蛋白質であり、哺乳類細胞内で容易に発現することが知られている。また、レニラルシフェラーゼの結晶構造

は不明であるが、ルミネッセンス活性のためにはN-末端といくつかのシステイン残基が重要であり（非特許文献6、7）、レニラルシフェラーゼの酵素反応は、ホタルルシフェラーゼの場合とは異なり、ATPを必要としない（非特許文献8）ことが知られている。さらに、ルシフェラーゼの基質であるセレンテラジンは哺乳類の細胞膜を貫通し、細胞基質中に急速に拡散することも知られている（非特許文献9、10）。

【0020】

レニラルシフェラーゼは、溶存酸素存在下においてセレンテラジンの励起状態化合物（オキシセレンテラジンモノアニオン）への酸化を触媒し、組織透過性を有する近赤外線領域（400nm～630nm）の広いバンドのルミネッセンスを発し、セレンテルアミドと二酸化炭素を生じさせる。

【0021】

この出願の発明者らは、このようなレニラルシフェラーゼの酵素反応に着目し、生細胞のどこで、いつ蛋白質相互作用が起こったのかを精度高く検出できるプローブを実現することを目的として鋭意研究を進めた結果、本願発明に至ったのである。

【0022】

図1および図2にこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブの構成と作用原理を示した。

【0023】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ（1）は、図1に示されるように、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチド（2a）を含むプローブA（1a）と、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチド（2b）を含むプローブB（1b）からなるものである（以下、このように分割されたレニラルシフェラーゼのN-およびC-末端をN-スプリットレニラルシフェラーゼ、C-スプリットレニラルシフェラーゼと呼ぶことがある。）。

【0024】

そして、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて蛋白質相互

作用を解析するには、プローブA (1 a) およびプローブB (1 b) を各々、その相互作用を調べたい二つの蛋白質 a および b (3 a および 3 b) に結合し、これらをセレンテラジンと溶存酸素の存在下で共存させる (I)。このとき、蛋白質 (3 a) および (3 b) が相互作用する (II) と、プローブA (1 a) および B (1 b) におけるN-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a) とC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 b) が近位に並置され、レニラルシフェラーゼ (2) の再構成が起こる (III)。そして、このレニラルシフェラーゼ (2) が発光触媒酵素として作用し、瞬時に、セレンテラジンを酸化分解し (IV)、生成される励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが生物発光 (4) として放出されるのである (V)。したがって、この生物発光 (4) を検出することにより蛋白質-蛋白質相互作用を解析することが可能となる。

【0025】

以上のとおりのこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1) において、プローブA (1 a) とプローブB (1 b) は、各々、N-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼのみからなるものであってもよいが、それぞれさらに、inteinのN-末端側のポリペプチド (6 a) とinteinのC-末端側のポリペプチド (6 b) を含有していてもよい。

【0026】

すなわち、この場合、図2に示されるように、蛋白質相互作用解析用プローブ (1) において、プローブAは、inteinのN-末端側のポリペプチド (6 a) とレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチド (2 a) を含むもの (以下プローブA' と呼ぶ) (1 c) となり、プローブBは、inteinのC-末端側のポリペプチド (6 b) とレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチド (2 b) を含むもの (以下プローブB' と呼ぶ) (1 d) となる。

【0027】

このような蛋白質相互作用解析用プローブを用いて蛋白質相互作用解析を解析するには、プローブA' (1 c) およびプローブB' (1 d) を各々相互作用を調べたい蛋白質 a および b (3 a および 3 b) に結合し、共存させる (I)。このとき、蛋白質 (3 a および 3 b) が相互作用すれば (II)、スプライシングが

起こり、各スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a、2 b) が連結してレニラルシフェラーゼ (2) が再構成される (III)。

【0028】

このとき、系内にセレンテラジンと酸素が共存していると、切り出された (II I') レニラルシフェラーゼ (2) を発光触媒酵素として、瞬時に、膜透過性基質であるセレンテラジンの酸化分解が起こり (IV)、励起カルボニル基が基底状態に戻るときのエネルギーが生物発光 (4) として放出される (V)。したがって、この生物発光 (4) を検出することにより蛋白質-蛋白質相互作用を解析することが可能となる。

【0029】

一方、蛋白質 a (3 a) と蛋白質 b (3 b) が相互作用 (II) しなければ、inteinのスプライシングが起こらないため、レニラルシフェラーゼ (2) は再構成 (III) されず、生物発光 (4) に顕著な変化が現れない。

【0030】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブにおいて使用される inteinとしては、種々の生物由来の公知物質が適用できる。例えば、*Saccharomyces cerevisiae* (酵母) S c e VMA、*Candida tropicalis* (カンジタ菌) C t r VMAなどに代表される真核生物由来のもの、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) M t u r e c Aなどの真正細菌由来のもの、*Thermoplasma acidophilum* (サーモプラスマアシドフィラム) T a c VMAなどの古細菌由来のもの等が挙げられる。

【0031】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1 c、1 d) において、蛋白質 a (3 a) と蛋白質 b (3 b) の相互作用により intein が自動的に切り出されるためには、inteinは、部位特異的エンドヌクレアーゼであることが好ましい。さらに、この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1 c、1 d) において、inteinのスプライシングが有効に起こるためには、蛋白質前駆体において、スプライシングに関与する二つの部位が隣接するように、正しく折り畳まれ、かつ、各部位が正確に並べられなければならない (非特許文献11)。したがっ

て、inteinとしては、生物由来のものをそのまま用いてもよいが、一部のアミノ酸残基を変換したり、削除したり、適当なリンカー配列を導入したりして、スプライシングが起こりやすいように設計されてもよい。

【0032】

以上のとおりのこの出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブでは、プローブA (1 a) およびプローブB (1 b) は、各々、N-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼのみからなるものであってもよいが、それぞれの末端にリンカー配列 (5 a、5 b) を有していてもよい。このようにリンカー配列 (5 a、5 b) を有する場合には、プローブA (1 a) とプローブB (1 b) はこれらのリンカー配列 (5 a、5 b) を介して蛋白質 (3 a、3 b) と結合する。リンカー配列 (5 a、5 b) としては、各種のものが例示され、とくに限定されないが、例えば3～20アミノ酸残基からなるもの、具体的には、グリシン-アラニン繰り返し配列を有するもの等が挙げられる。

【0033】

また、同様に、プローブA' (1 c) およびプローブB' (1 d) は、各々、inteinのN-またはC-末端側のポリペプチド (6 a、6 b) とN-またはC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a、2 b) のみからなるものであってもよいが、これら以外に、前記と同様のリンカー配列 (5 a、5 b) 等を含んでいてもよい。つまり、プローブA' (1 c) およびプローブB' (1 d) においてinteinのポリペプチド (6 a、6 b) とスプリットレニラルシフェラーゼ (2 a、2 b) は、直接結合されていてもよいし、リンカー配列 (5 a、5 b) を介して結合されていてもよいのである。

【0034】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブ (1) において、用いられるN-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a および 2 b) とは、レニラルシフェラーゼを適当な位置で分割したN-末端側と残るC-末端側を意味するが、これらN-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a および 2 b) は、蛋白質a および b (3 a、3 b) の相互作用 (III) により、あるいは、蛋白質a および b (3 a、3 b) の相互作用により生じるintein (6) のスプラ

イシングにより、直接ペプチド結合し、再構成 (IV) されるものである。

【0035】

したがって、このようなN-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ (2 a および 2 b) が再構成 (IV) 前 (個々のとき) には発光活性を示さず、再構成により酵素活性を取り戻すようにするために、活性中心を2つに分割するような分け方をする必要がある。具体的には、レニラルシフェラーゼをシステイン (Cys)、セリン (Ser)、またはチロシン (Tyr) の位置で分割することを試みた。

【0036】

なお、後述の実施例にも示されるとおり、発明者らの研究によれば、プローブ A (または A') におけるN-スプリットレニラルシフェラーゼを、ルシフェラーゼをSer91とTyr92の間で分割して得られるN-スプリットレニラルシフェラーゼとし、残るC-末端側を、プローブ B (または B') におけるC-スプリットレニラルシフェラーゼとすることにより、とくに精度高い検出が可能となる。

【0037】

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質相互作用解析用プローブが提供されるが、これを用いて蛋白質-蛋白質相互作用を解析するには、前記のとおり、一方のプローブ (例えばプローブ A) を相互作用を確かめたい一方の蛋白質 a に連結させ、もう一方のプローブ (プローブ B) を相互作用を確認したいもう一方の蛋白質 b に連結して両者を共存させ、生物発光 (4) を検出、測定すればよい。なお、このとき、各蛋白質 (3 a、3 b) とプローブ (1 a、1 b、1 c、1 d) の連結方法は、蛋白質やプローブに影響を及ぼさなければどのような方法であってもよい。例えば、通常用いられる化学的、生物化学的、あるいは、遺伝子工学的手法等が適用できる。

【0038】

この出願の発明では、以上のとおりの蛋白質相互作用解析用プローブをセレンテラジンと酸素の存在下で共存させる方法としては、蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a および 1 b、または 1 c および 1 d) を各々相互作用を確認した蛋白質 a および b (3 a、3 b) に結合させ、それらをセレンテラジンを含む溶液に添加して共存させる方法があげられる。このような方法で蛋白質-蛋白質相

相互作用を解析を *in vitro* で検出・定量できる。

【0039】

また、この出願の発明では、蛋白質相互作用解析用プローブ (1) におけるプローブ A (1 a) を連結した蛋白質 a とプローブ B (1 b) を連結した蛋白質 b、または蛋白質相互作用解析用プローブ A' (1 c) を連結した蛋白質 a (3 a) とプローブ B' (1 d) を連結した蛋白質 b (3 b) を組み込んだ発現ベクターを、個々の培養細胞に導入する方法により、蛋白質 a および b (3 a、3 b) をセレンテラジンおよび酸素と共存させることができる。なお、酸素は細胞内に存在する濃度で十分であり、新たに酸素を供給する必要はない。

【0040】

このとき、発現ベクターとしては、動物細胞発現用のプラスミドベクターが好ましく用いられる。このようなプラスミドベクターを細胞に導入する方法としては、電気穿孔法、リン酸化カルシウム法、リポソーム法、DEAE デキストラン法等の公知の方法を採用することができる。このように、蛋白質相互作用解析用プローブ (1 a と 1 b、または 1 c と 1 d) を連結した蛋白質 (3 a と 3 b) を組み込んだ発現ベクターを細胞に導入する方法を用いることにより、細胞内で蛋白質相互作用解析用プローブ (1)、蛋白質 (3)、セレンテラジンおよび酸素が共存でき、細胞を破壊することなく、蛋白質-蛋白質相互作用を検出・定量する *in vivo* 法が可能となる。

【0041】

さらに、この出願の発明の蛋白質相互作用の解析方法では、蛋白質相互作用解析用プローブ A (1 a) を連結した蛋白質 a (3 a) とプローブ B (1 b) を連結した蛋白質 b (3 b)、または蛋白質相互作用解析用プローブ A' (1 c) を連結した蛋白質 a (3 a) とプローブ B' (1 d) を連結した蛋白質 b (3 b) を発現するポリヌクレオチドを細胞内に導入し、非ヒト動物全能性細胞を個体発生することによって、この動物またはその子孫動物の全細胞において蛋白質相互作用解析用プローブ (1)、蛋白質 (3)、セレンテラジンおよび酸素を共存させることもできる。このとき、酸素は、生体内に存在する濃度で十分であり、新たに添加する必要はない。

【0042】

なお、この出願の発明では、このようにして得られるトランスジェニック非ヒト動物をも提供する。トランスジェニック非ヒト動物は、公知の作成法（例えば非特許文献12）に従って作成することができる。このようなトランスジェニック非ヒト動物は、すべての体細胞に蛋白質相互作用解析用プローブ（1）と蛋白質（3）を保有しているため、例えば、その体内に医薬品や毒物などの試料物質を導入し、細胞および組織における蛋白質相互作用を解析することによって、蛋白質-蛋白質相互作用に関わる細胞内シグナル増強/抑制物質を精度高くスクリーニングすることができる。

【0043】

この出願の発明の蛋白質-蛋白質相互作用の解析方法では、前記のとおり作用原理および操作により発せられるルミネッセンス（生物発光）（4）を検出することにより蛋白質-蛋白質相互作用が起こったことを確認できる。また、レニラルシフェラーゼによる生物発光は組織透過性であることから、細胞内での発光を観察して画像化すれば、蛋白質-蛋白質相互作用が起こったタイミングのみならず、部位をも特定できる。さらに、特定の試料の添加や濃度など、条件を変化させた際の発光強度の変化を測定することにより、蛋白質-蛋白質相互作用を定量することもできる。さらにまた、発光強度の変化を経時的に測定することにより、蛋白質-蛋白質相互作用の開始から終了までを追跡することもできる。

【0044】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0045】

【実施例】

蛋白質のリン酸化に伴って、Y941ペプチド（配列番号2）とN-末端SH2ドメイン（SH2n）の間で生じる、公知の蛋白質-蛋白質相互作用（非特許文献13～15）について、本願発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて可視化した。

【0046】

なお、以下の実施例において、試薬は次のものを使用した。

【0047】

制限酵素、修飾酵素およびリガーゼはTakara Biomedicals (東京、日本) から購入した。

【0048】

哺乳類において最も頻繁に用いられるコドンを含むレニラルシフェラーゼをコードする、合成レニラルシフェラーゼ遺伝子ベクター (hRL-CMV) およびレニラルシフェラーゼアッセイキットはPromega Co. (Madison, WI) から購入した。

【0049】

哺乳類の発現ベクターであるpcDNA3.1(+)およびpIRESは、それぞれInvitrogen (Groningen, オランダ) およびClonetech (Palo Alto, CA) より入手した。

【0050】

Ham's F-12培地、ウシ胎児血清 (FBS) およびLipofectAMINEはGibco BRL (Rockville, MD) から入手した。

【0051】

抗myc抗体、抗flag抗体および抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) はSanta Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) より購入した。

【0052】

アルカリホスファターゼ標識化抗ウサギおよび抗マウス抗体は、Jackson ImmunoResearch Lab., Inc. (Pennsylvania, PA) より購入した。

【0053】

ニトロセルロース膜はAmersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, イギリス) より入手した。

【0054】

CDP-STARの化学ルミネッセンス基質はNew England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) より購入した。

<実施例1>蛋白質相互作用解析用プローブの最適化

インスリン受容体基質-1 (insulin receptor substrate-1: 以下、IRS1) 由来

のY941ペプチド内の941チロシン残基は、インスリン刺激されると、インスリン受容体によりリン酸化され、チロシンホスファターゼにより脱リン酸化される（非特許文献15、16）。また、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼのp85サブユニット（p85 330-429）由来のSH2nは、IRS1内部のリン酸化された941-チロシン残基に結合する（非特許文献17、18）。

(1) プラスミドの構築

レニラルシフェラーゼの遺伝子をシステイン、セリンおよびチロシン近傍の8箇所分割し、2個の不活性なフラグメント（N-スプリットレニラルシフェラーゼ、C-スプリットレニラルシフェラーゼ）にした。

【0055】

配列番号1および図3にレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列と分割部位を示した。なお、本実施例においては、レニラルシフェラーゼ（hRL）の124-システイン残基がアラニンに置換され、ルミネッセンス活性が増大されたレニラルシフェラーゼ変異体（hRL124C/A：配列番号3）（非特許文献7）を用いた。

【0056】

N-スプリットレニラルシフェラーゼ（hRLn）およびC-スプリットレニラルシフェラーゼ（hRLc）を、それぞれ蛋白質（Y941とSH2n）に結合させた。各スプリットレニラルシフェラーゼ融合蛋白質（sRL）のプラスミドの構成を図4に示した。なお、これらのプラスミドは、いずれも開始コドン上流にCMV-プロモーター配列を有するものとした。

【0057】

Y941のアミノ酸配列はTEEAYMKMDLGPG（配列番号2）であり、これはIRS1内部のチロシンリン酸化ドメインとなっている。SH2nはウシホスファチジルイノシトールのp85サブユニットのN-末端SH2ドメインである。また、図4において、点線部分はリボソーム内部進入部位（IRES）を示す。さらに、sRLは、いずれも（翻訳終了コドン）－（リボソーム内部進入部位）－（翻訳開始コドン）より構成されるカセットを有するものとした。

【0058】

さらに、蛋白質－蛋白質相互作用が生じた際に、N-およびC-スプリットレ

ニラルシフェラーゼが確実に近接するようにするために、N-スプリットレニラルシフェラーゼとY941の間に、G-Aリピートを含む柔軟な18アミノ酸残基からなるリンカー配列（配列番号4）を、SH2nとC-スプリットレニラルシフェラーゼの間に同様のリンカー配列（配列番号5）を挿入した。さらに、MycおよびFLAGエピトープをN-およびC-スプリットレニラルシフェラーゼの下流に挿入した。

【0059】

なお、全てのプラスミド構築サブクローニングの微生物宿主としては、大腸菌株DH5 α を用いた。また、プラスミドは、全てジーンアナライザーABI prism 310（PE Biosystems、東京、日本）を用いた配列解析により確認した。

（2）細胞培養と形質移入

CHO-HIR細胞の生育は、10 %熱不活性化FBS（Filtron）、100 unit/mLペニシリン、および100 μ g/mLストレプトマイシンを添加したHam's F-12培地中で行った。形質移入はLipofectAMINE 2000を用いて行った。

【0060】

細胞を6ウェルの培養プレート上に播種し、前記いずれかのプラスミドを2 ng用いて形質移入を行った。形質移入の6時間後にLipofectAMINEを含む培地をFBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加したHam's F-12培地に置換し、40時間インキュベートして各蛋白質相互作用解析用プローブを発現させた。

（3）免疫沈降およびイムノブロット分析

CHO-HIR細胞を、100 nMインスリンを用いて37 $^{\circ}$ Cで5分間刺激し、氷冷した2x免疫沈降緩衝液（10 mM Tris-HCl（pH 7.4）、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM NaF、0.2 mM オルソバナジン酸ナトリウム、10 μ g/mLロイペプチン、10 μ g/mLペプスタチン、0.2 mMフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、2 % IGEPAL CA630、1 % Triton X-100）により機械的に破碎した。

【0061】

N-融合蛋白質は抗myc抗体により4 $^{\circ}$ Cで1時間処理し、CHO-HIR細胞の全細胞破碎液から免疫沈降した。この免疫沈降物を、蛋白質Gセファロース4FFビーズを用いて吸着し、次いで氷冷した免疫沈降緩衝液を用いて5回洗浄した。

【0062】

試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、Y941リン酸化については抗リン酸化チロシン抗体 (1:500) を用いて、N-末端蛋白質の評価には抗myc抗体 (1:500) を用いて、C-末端蛋白質の評価には抗flag抗体 (1:1000) を用いて分析した。

(4) 発光測定

37℃でCHO-HIR細胞のインスリン刺激を行った。また、発光強度はレニラルシフェラーゼアッセイキットを用いて測定した。

【0063】

次に冷PBSを用いて細胞を2回洗浄し、破碎した。破碎液を4℃で15,000 g、30秒間遠心分離し、上澄の一部について、Minilumat LB9506照度計 (Berthold GmbH & Co. KG, Wildbad, ドイツ) を用いて発光強度を10秒間測定した。上澄中の蛋白質濃度はBradford法により測定した。

(5) 結果

レニラルシフェラーゼの分割箇所と、蛋白質相互作用により生じた発光 (インスリンの存在下における発光とインスリンの非存在下における発光の比) の関係を図5 (a) に示した。また、全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) による発光強度に対する各蛋白質相互作用解析用プローブの相対発光強度を図5 (b) に示した。

【0064】

なお、各測定は、培養プレートの異なるウェルを用いて3回行った。

【0065】

レニラルシフェラーゼがSer91とTyr92の間で分割された蛋白質相互作用解析用プローブ (SRL91) を発現したCHO-HIR細胞は、 10^{-7} Mインスリン存在下において、非存在下の場合と比べて25倍の発光強度を示した。

【0066】

一方、レニラルシフェラーゼが他の位置で分割された蛋白質相互作用解析用プローブでは、 10^{-7} Mインスリン存在下で2~4倍の増加が確認された。

<実施例2>

実施例 1 において、sRL91を発現したCHO-HIR細胞でのレニラルシフェラーゼの補完が蛋白質のリン酸化に起因する蛋白質-蛋白質相互作用により引き起こされたものであることを確認するために、sRL91におけるY941ペプチド中の941番目のチロシン残基のリン酸化部位をフェニルアラニン残基に変換し、sRL91変異体 (sRL91F) を作成した。N-末端側およびC-末端側プローブを各々配列番号 6 および 7 に示した。

【0067】

このsRL91Fを用いて実施例 1 と同様の操作を行い、インスリン刺激の存在下および非存在下での発光強度を測定した。同様に、図 4 (c) および図 4 (d) のプラスミドを用いてsRL91のN-末端側およびC-末端側のみを個別にCHO-HIR細胞に発現させ、各々の発光強度を測定した。

【0068】

結果を図 6 に示した。

【0069】

sRL91Fを発現したCHO-HIR細胞においては、インスリン刺激時の酵素活性の増加は見られなかった。また、sRL91のN-末端側およびC-末端側のみを個別に発現したCHO-HIR細胞では、インスリンの非存在下のみならず存在下においても、ルミネッセンス活性が完全に消失していた。

【0070】

以上より、Y941とSH2n間の蛋白質-蛋白質相互作用により、レニラルシフェラーゼの補完が起こることが確認された。したがって、レニラルシフェラーゼをSer91とTyr92の間で分割したスプリットレニラルシフェラーゼを含む本願発明のプローブ (sRL91) が蛋白質相互作用解析用プローブとして有効であることが示された。

<実施例 3> 蛋白質-蛋白質相互作用の経時変化測定

前記の方法によりsRL91を発現した細胞を、100 nMまたは10 pMインスリンを添加した培地において、1分、5分、10分、30分および60分間、37℃でインキュベートし、直ちにルミネッセンスを測定した。

【0071】

Y941とSH2nの間の相互作用の経時変化を図7に示した。

【0072】

発光強度はインスリン刺激の5分後に増加し、以後は漸減した。

【0073】

さらに、sRL91を発現した細胞を、 10^{-7} Mインスリンを添加した培地において、1分、5分、10分、30分および60分間、37℃でインキュベートし、抗myc抗体を用いて全細胞の破碎液の免疫沈降を行った。抗リン酸化チロシン抗体と抗myc抗体を用いて免疫プロットングを行った。なお、抗体染色の可視化は、CDP-STARを用い、LAS-1000とイメージアナライザ (Fujifilm Co.、東京、日本) により行った。

【0074】

得られた結果を図8に示した。

【0075】

発光強度の経時変化とイムノプロットングの結果は一致し、蛋白質相互作用の時間依存性は、チロシンのリン酸化および脱リン酸化によるものであることが示唆された。

【0076】

以上より、sRL91の発光強度の変化が生細胞中で進行する蛋白質-蛋白質相互作用を直接的に反映することが確認された。

<実施例4>

以上のような発光は、膜透過性基質であるセレンテラジンの存在下で、蛋白質-蛋白質相互作用が起こり、レニラルシフェラーゼが補完されることにより生じる。

【0077】

そこで、次に本願発明の蛋白質相互作用解析用プローブを用いて生細胞内における特定の蛋白質-蛋白質相互作用の発生部位および時間について非侵襲的に画像化することを検討した。

【0078】

そこで、sRL91を発現したCHO-HIR細胞におけるY941とSH2nの間の蛋白質-蛋白質

質相互作用を画像化した。なお、細胞は、カールツァイス社のAxiovertsl00顕微鏡に、40倍の油浸対物レンズを付けたTill Vision V3.02 (PHOTONICS, Planegg, ドイツ) により制御された冷却装置付きカメラMicroMax (Roper Scientific Inc, Tucson, AZ) を取り付け、室温下で画像化した。

【0079】

図9に、sRL91を発現したCHO-IR細胞の 10^{-7} Mインスリン刺激の非存在下 (a) および存在下 (b) における顕微鏡像と全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現したCHO-IR細胞の顕微鏡像を示した。

【0080】

なお、撮影はCCDカメラを用い、20 %セレンテラジン基質緩衝液を添加したPBS中で、露出時間をそれぞれ300秒 (a、b) および60秒 (c) として実施した。発光強度はカラースケールで表した。

【0081】

補完されたレニラルシフェラーゼにより放出された発光の増強は、インスリン刺激時には細胞膜下においてのみ見られた (図9 b)。一方、インスリン非存在下では、このような鮮やかな対照は見られなかった。

【0082】

以上より、インスリン刺激によるY941とSH2nの間の相互作用が細胞膜下においてのみ生じることが示された。

【0083】

さらに、全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現したCHO-HIR細胞では、細胞全体において均一にルミネッセンスが放出された (図9 c) ことから、図9 bの結果が細胞膜直下におけるセレンテラジンの過剰蓄積によるものではないことが示された。

【0084】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この発明によって、生細胞における蛋白質-蛋白質相互作用を直接可視化できる蛋白質相互作用解析用プローブが提供される。このような蛋白質相互作用解析用プローブは、蛋白質-蛋白質相互作用によるレニ

ラルシフェラーゼの補完を用いるものであるが、他の補完酵素系で用いられる拡散性の生成物（非特許文献19～23）とは異なり、補完レニラルシフェラーゼによる生物発光は、生細胞や生物内において、蛋白質-蛋白質相互作用が発生した部位と時間を特定できる点で有用性が高い。

【0085】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Probe for visualizing protein interaction and method of analyzing protein-protein interaction using the same

<130> NP03072-SH

<160> 6

<210> 1

<211> 300

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<400> 1

Met	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Asp	Pro	Glu	Gln	Arg	Lys	Arg	Met	Ile
1				5					10				15	
Thr	Gly	Pro	Gln	Trp	Trp	Ala	Arg	Cys	Lys	Gln	Met	Asn	Val	Leu
16				20					25				30	
Asp	Ser	Phe	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Glu	Lys	His	Ala	Glu	Asn
31				35					40				45	
Ala	Val	Ile	Phe	Leu	His	Gly	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Trp
46				50					55				60	
Arg	His	Val	Val	Pro	His	Ile	Glu	Pro	Val	Ala	Arg	Cys	Ile	Ile
61				65					70				75	
Pro	Asp	Leu	Ile	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Asn	Gly
76				80					85				90	
Ser	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp	Phe

91	95	100	105
Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp			
106	110	115	120
Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Cys Tyr Glu His Gln Asp			
121	125	130	135
Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile			
136	140	145	150
Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu			
151	155	160	165
Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe			
166	170	175	180
Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu			
181	185	190	195
Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly			
196	200	205	210
Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu			
211	215	220	225
Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr			
226	230	235	240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile			
241	245	250	255
Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala			
256	260	265	270
Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His			
271	275	280	285
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Gln			
286	290	295	300

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 2

Thr Glu Glu Ala Tyr Met Lys Met Asp Leu Gly Pro Gly
 1 5 10

<210> 3

<211> 32

<211> 300

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<400> 3

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile
 1 5 10 15
 Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu
 16 20 25 30
 Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn
 31 35 40 45
 Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp
 46 50 55 60
 Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile
 61 65 70 75
 Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly
 76 80 85 90
 Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe
 91 95 100 105
 Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp
 106 110 115 120
 Trp Gly Ala Ala Leu Ala Phe His Tyr Cys Tyr Glu His Gln Asp

121	125	130	135
Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile			
136	140	145	150
Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu			
151	155	160	165
Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe			
166	170	175	180
Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu			
181	185	190	195
Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly			
196	200	205	210
Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu			
211	215	220	225
Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr			
226	230	235	240
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile			
241	245	250	255
Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala			
256	260	265	270
Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His			
271	275	280	285
Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Asn Tyr Ile Gln			
286	290	295	300

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 4

Cys Leu Ser Leu Ala Ser Asn Asn Gly Asn Gly Arg Asn Gly Ala
1 5 10 15

Ser Leu Glu

16

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 5

Pro Arg Gly Asn Asn Gly Gly Asn Asn Asp Val Met Ala Ile Ala
1 5 10 15

Ala Asn

16

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 6

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile
1 5 10 15

Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu
16 20 25 30

Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn
31 35 40 45

Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp
46 50 55 60

Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile

61	65	70	75
Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly			
76	80	85	90
Ser Cys Leu Ser Leu Ala Ser Asn Asn Gly Asn Gly Arg Asn Gly			
91	95	100	105
Ala Ser Leu Glu Thr Glu Glu Tyr Met Lys Met Asp Leu Gly Pro			
106	110	115	120
Gly Thr Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu			
121	125	130	

<210> 7

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Synthesized Oligopeptide

<400> 7

Met Asp Ala Glu Trp Tyr Trp Gly Asp Ile Ser Arg Glu Glu Val			
1	5	10	15
Asn Glu Lys Leu Arg Asp Thr Ala Asp Gly Thr Phe Leu Val Arg			
16	20	25	30
Asp Ala Ser Thr Lys Met His Gly Asp Tyr Thr Leu Thr Leu Arg			
31	35	40	45
Lys Gly Gly Asn Asn Lys Leu Ile Lys Ile Phe His Arg Asp Gly			
46	50	55	60
Lys Tyr Gly Phe Ser Asp Pro Leu Thr Phe Asn Ser Val Val Glu			
61	65	70	75
Leu Ile Asn His Tyr Arg Asn Glu Ser Leu Ala Gln Tyr Asn Pro			
76	80	85	90
Lys Leu Asp Val Lys Leu Leu Tyr Pro Val Ser Lys Tyr Gln Gln			
91	95	100	105

Pro	Arg	Gly	Asn	Asn	Gly	Gly	Asn	Asn	Asp	Val	Met	Ala	Ile	Ala
106				110					115					120
Ala	Asn	Tyr	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Thr	Ala	Trp
121				125					130					135
Phe	Glu	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Lys	Ile	Ile	Phe	Val	Gly	His
136				140					145					150
Asp	Trp	Gly	Ala	Cys	Leu	Ala	Phe	His	Tyr	Ser	Tyr	Glu	His	Gln
151				155					160					165
Asp	Lys	Ile	Lys	Ala	Ile	Val	His	Ala	Glu	Ser	Val	Val	Asp	Val
166				170					175					180
Ile	Glu	Ser	Trp	Asp	Glu	Trp	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Asp	Ile	Ala
181				185					190					195
Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Glu	Gly	Glu	Lys	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Asn
196				200					205					210
Phe	Phe	Val	Glu	Thr	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ile	Met	Arg	Lys	Leu
211				215					220					225
Glu	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Lys	Glu	Lys
226				230					235					240
Gly	Glu	Val	Arg	Arg	Pro	Thr	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Glu	Ile	Pro
241				245					250					255
Leu	Val	Lys	Gly	Gly	Lys	Pro	Asp	Val	Val	Gln	Ile	Val	Arg	Asn
256				260					265					270
Tyr	Asn	Ala	Tyr	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Asp	Leu	Pro	Lys	Met	Phe
271				275					280					285
Ile	Glu	Ser	Asp	Pro	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Ala	Ile	Val	Glu	Gly
286				290					295					300
Ala	Lys	Lys	Phe	Pro	Asn	Thr	Glu	Phe	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Leu
301				305					310					315
His	Phe	Ser	Gln	Glu	Asp	Ala	Pro	Asp	Glu	Met	Gly	Lys	Tyr	Ile

316	320	325	330
Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln Pro Arg Asp			
331	335	340	345
Tyr Lys Asp Asp Val Val Lys			
346	350		

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブの一例とその作用原理を表す概略模式図である。

【図 2】

この出願の発明の蛋白質相互作用解析用プローブの別の例とその作用原理を表す概略模式図である。

【図 3】

この出願の発明の実施例において使用されたレニラルシフェラーゼのアミノ酸配列と分割部位を示した概略模式図である。

【図 4】

この出願の発明の実施例において使用されたスプリットレニラルシフェラーゼ融合蛋白質 (sRL) のプラスミドの構成を示した図である。(a : hRL124C/A、b : sRL、c : sRL91のN-末端側、d : sRL91のC-末端側、e : sRL91F)

【図 5】

この出願の発明の実施例において、レニラルシフェラーゼの分割箇所と、蛋白質相互作用により生起した発光の関係を示した図である。(a : インスリンの存在下における発光とインスリンの非存在下における発光の比、b : 全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) による発光強度に対する各蛋白質相互作用解析用プローブの相対発光強度)

【図 6】

この出願の発明の実施例において、sRL91Fを用いた際のインスリン存在下および非存在下での発光強度を示した図である。(a : sRL91F、b : sRL91のN-末端側のみ、c : sRL91FのC-末端側のみ)

【図 7】

この出願の発明の実施例において、sRL91を用いた際のインスリンの添加量とY941とSH2nの間の相互作用の経時変化を示した図である。

【図 8】

この出願の発明の実施例において、sRL91を用いた際のインスリン添加後のY941とSH2nの相互作用の経時変化をイムノプロットティングにより示した図である。

【図 9】

この出願の発明の実施例において、CHO-IR細胞の顕微鏡像を示す図である。（
a : sRL91を発現したCHO-IR細胞においてインスリン刺激の非存在下、b : 10^{-7} Mインスリン刺激の存在下、c : 全長レニラルシフェラーゼ (hRL124C/A) を発現したCHO-IR細胞)

【符号の説明】

- 1 蛋白質相互作用解析用プローブ
 - 1 a プローブA
 - 1 b プローブB
 - 1 c プローブC
 - 1 d プローブD
- 2 レニラルシフェラーゼ
 - 2 a N-スプリットレニラルシフェラーゼ
 - 2 b C-スプリットレニラルシフェラーゼ
- 3 a 蛋白質 a
- 3 b 蛋白質 b
- 4 生物発光
- 5 a リンカー配列
- 5 b リンカー配列
- 6 a inteinのN-末端側のポリペプチド
- 6 b inteinのC-末端側のポリペプチド
- I 共存
- II 相互作用

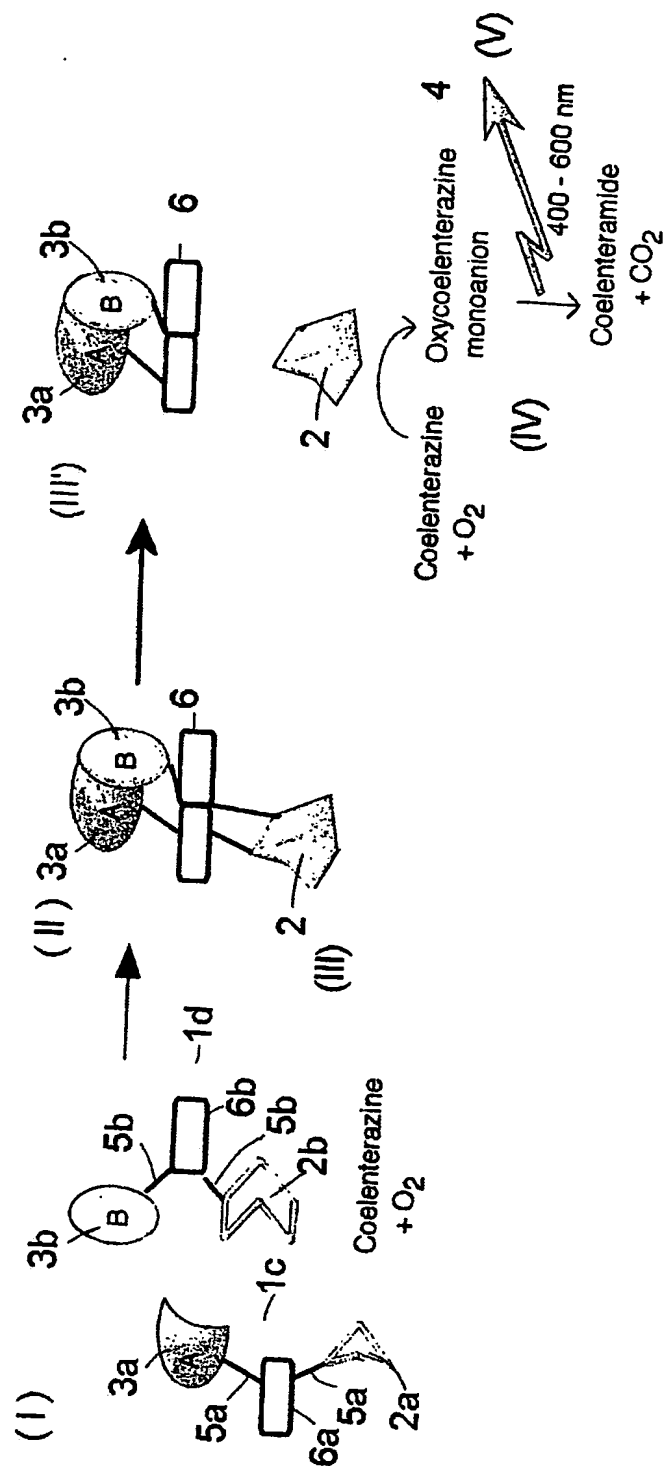
III 再構成

III' 切り出し

IV 酸化分解

V 発光

【図 2】

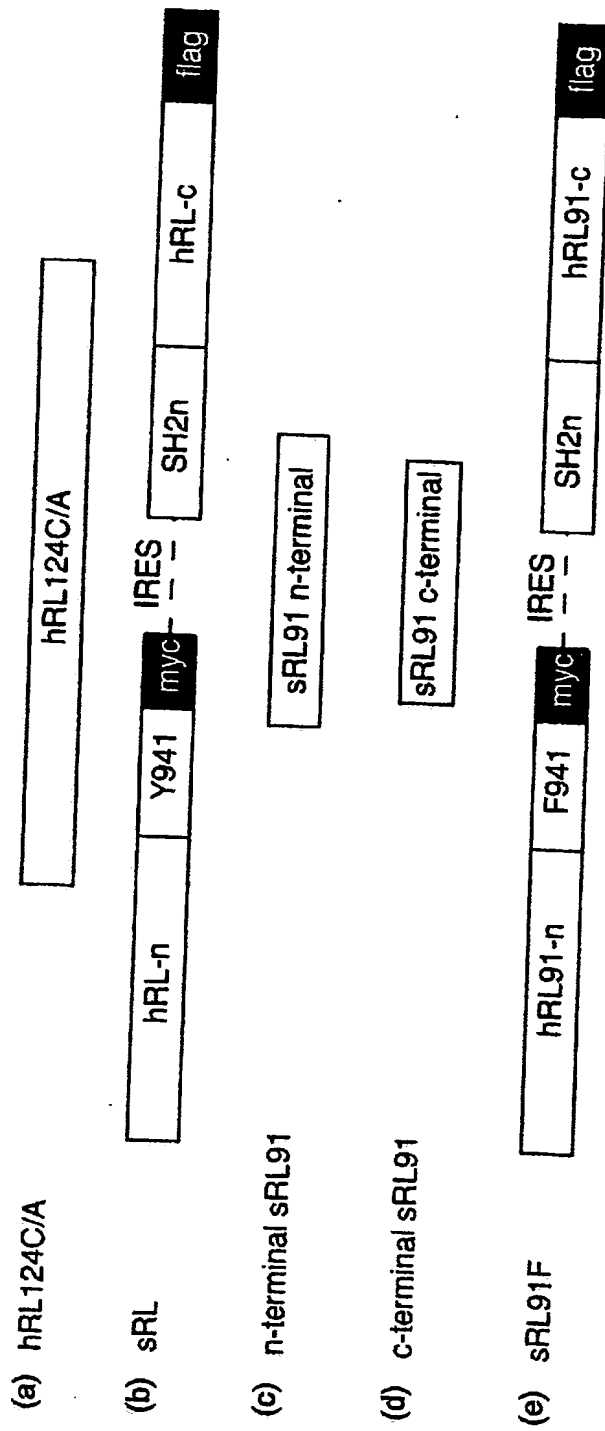


【図 3】

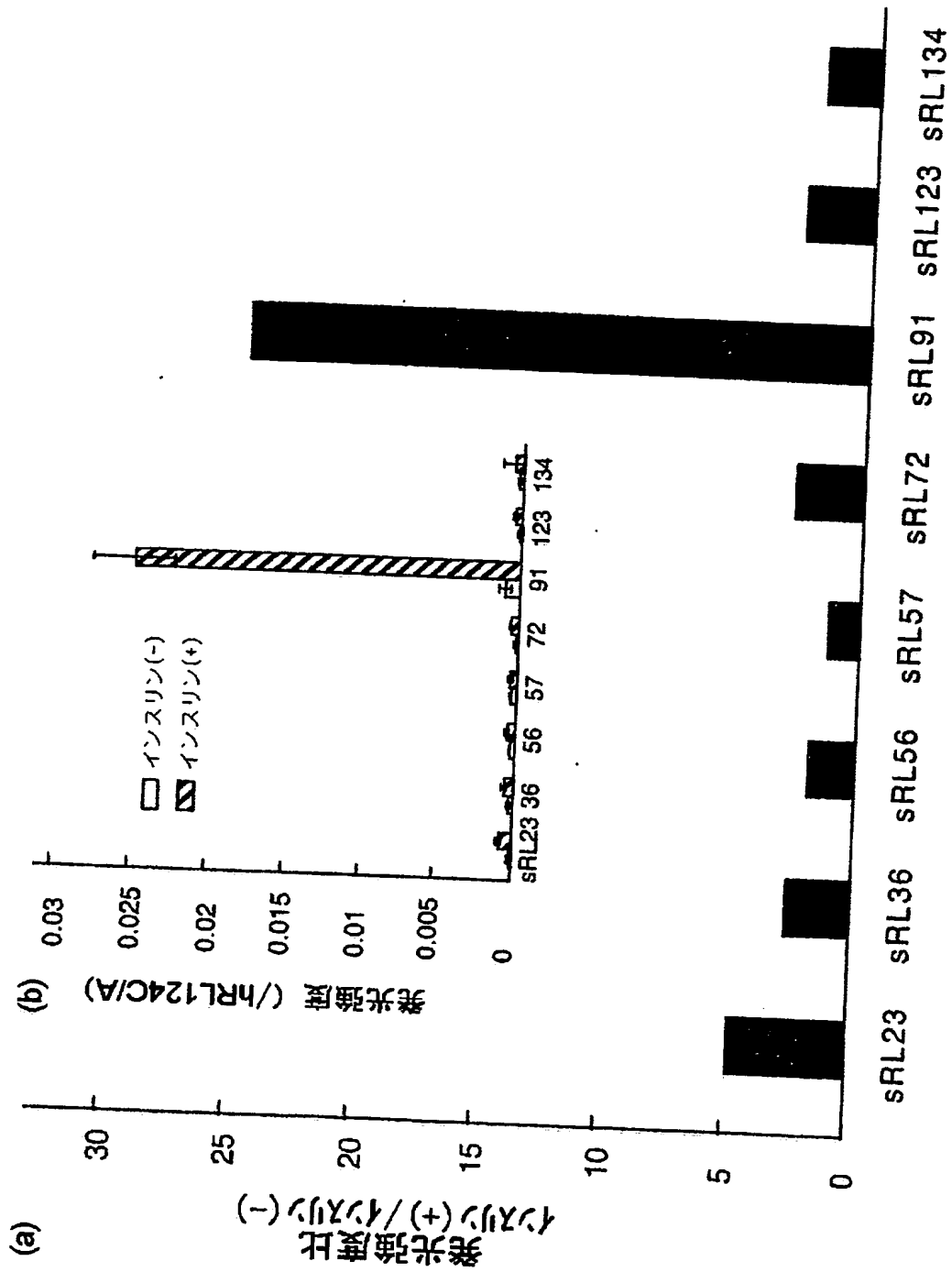
MTSKVYDPEQRKRMITGPPQW^{sRL23}W^{sRL36}ARCKQ^{sRL56}M^{sRL57}NVLD^{sRL72}SFIN^{sRL91}Y^{sRL123}YDSEKHAENAVIFL
 HGNAASSYL^{sRL124}WRHVPHIEPV^{sRL134}ARCII^{sRL134}PD^{sRL134}LIGMGKSGKSGNGSYRLLDH^{sRL134}YKY
 LTAWFELLNLPKKIIFVGH^{sRL134}DWGA^{sRL134}CLAFHYCYEHQDKIKAI^{sRL134}VHAESVVDVI
 ESWDEWPDIEEDIALIKSEEGEKMVLENNFFVET^{sRL134}MLPSKIMRKLEPEEFA
 AYLEPFKEKGEVRRPTLSWPREIPLVKGGKPDVVQIVRNYNAYLRASDDL
 PKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPNTEFVKVKGLHFSQEDAPDEMGNV

IQ

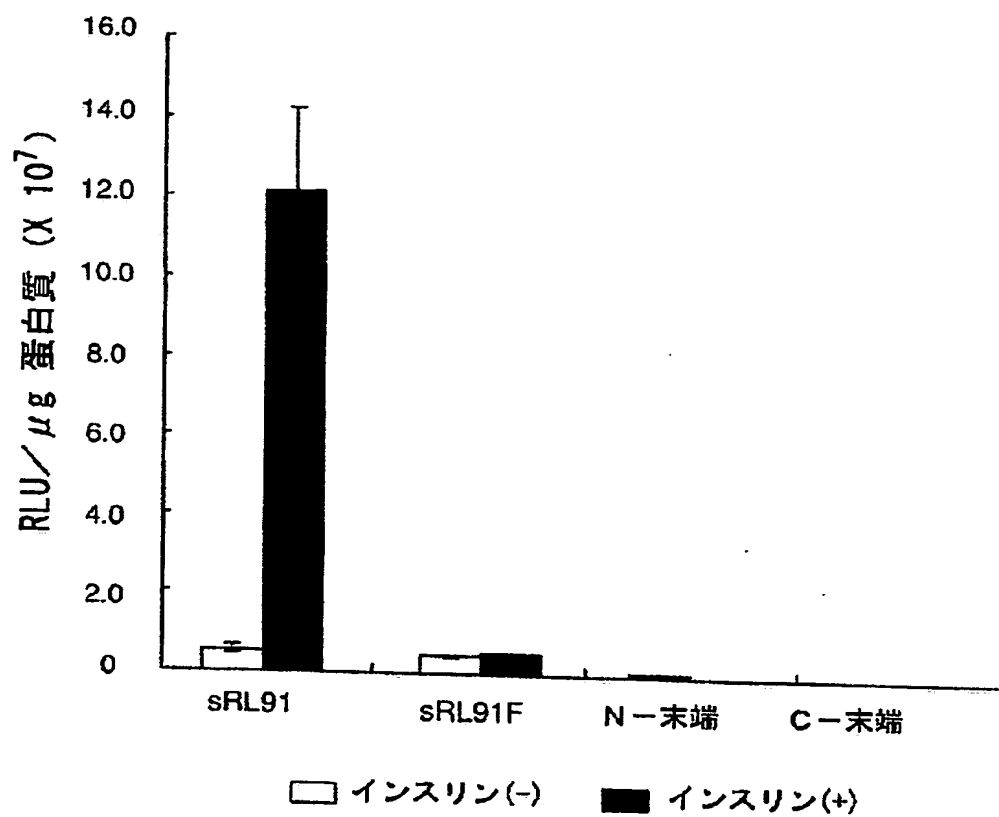
【図 4】



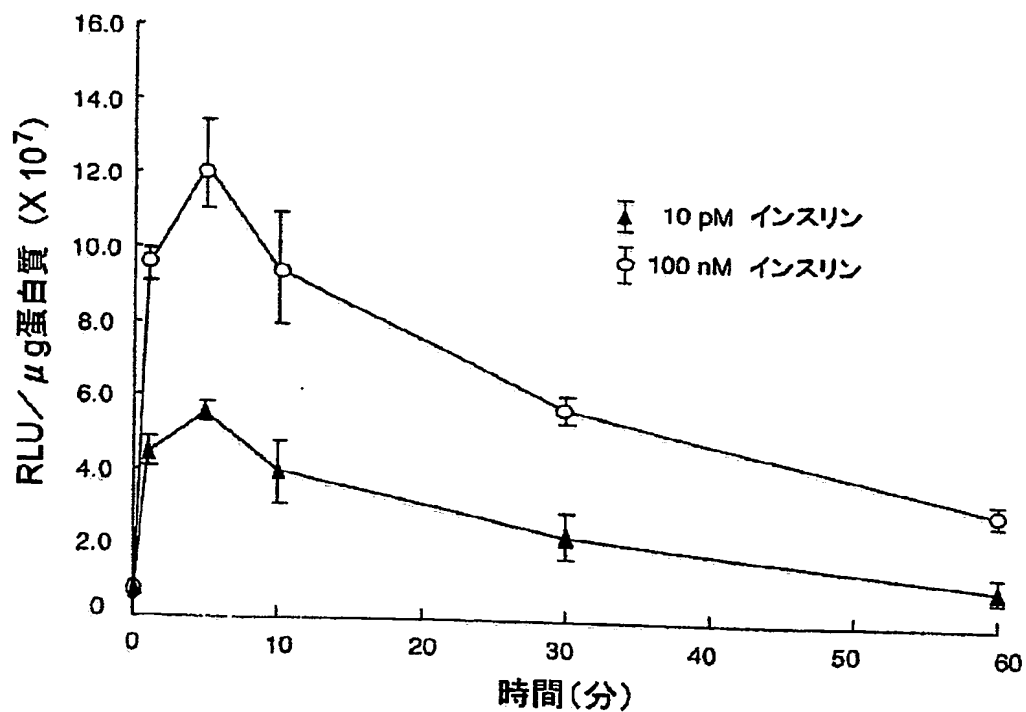
【図5】



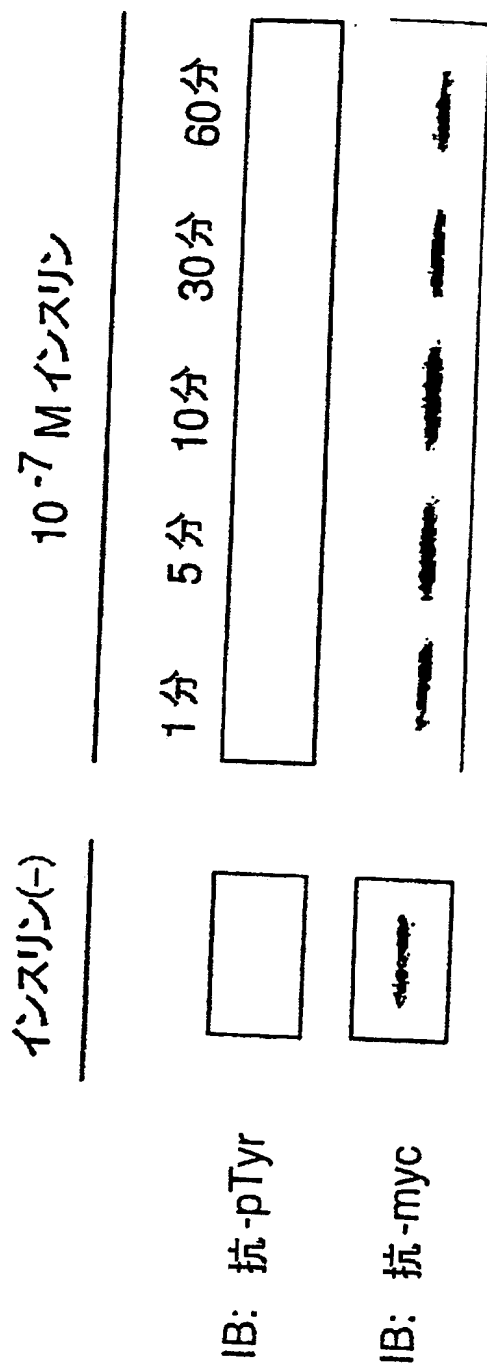
【図6】



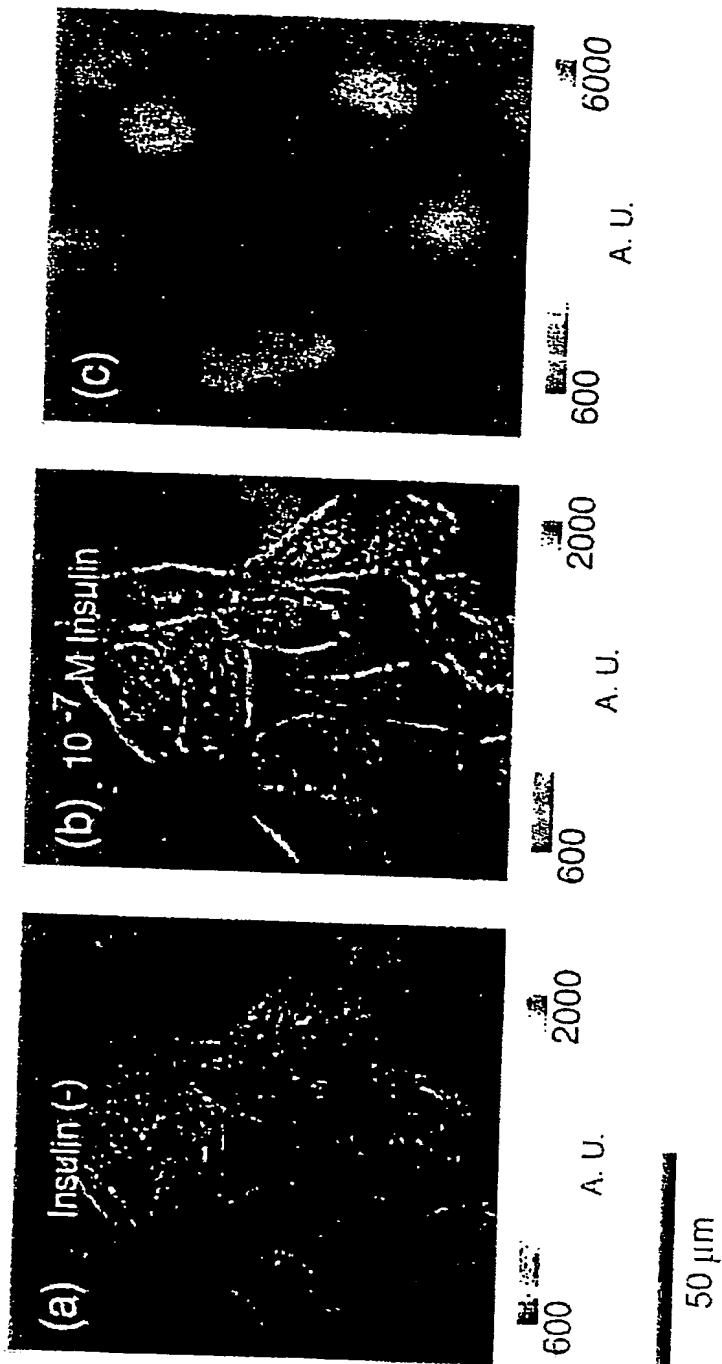
【図7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生細胞内の、どこで、いつ蛋白質-蛋白質相互作用が生起したかを定量的に検出するためのプローブと、それを用いた蛋白質相互作用の検出・定量方法を提供する。

【解決手段】 二つの蛋白質間の相互作用を解析するためのプローブであって、少なくともレニラルシフェラーゼのN-末端側のポリペプチドを含むプローブAと、少なくともレニラルシフェラーゼの残るC-末端側のポリペプチドを含むプローブBの二つのプローブからなる蛋白質相互作用解析用プローブとする。

【選択図】 図1

【書類名】

出願人名義変更届 (一般承継)

【提出日】

平成15年10月31日

【あて先】

特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】

特願2003-145466

【承継人】

【識別番号】

503360115

【住所又は居所】

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

【氏名又は名称】

独立行政法人科学技術振興機構

【代表者】

沖村 憲樹

【連絡先】

〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】

【物件名】

権利の承継を証明する書面 1

【援用の表示】

平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

【物件名】

登記簿謄本 1

【援用の表示】

平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。



特願 2003-145466

ページ: 1

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏名

科学技術振興事業団

特願 2003-145466

ページ: 2/E

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日
[変更理由]
住所
氏名

2003年10月 1日
新規登録
埼玉県川口市本町4丁目1番8号
独立行政法人 科学技術振興機構

出証番号 出証特 2004-3054477

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.